

氏名（本籍）	辻 美恵子（大阪府）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲 第153号
学位授与年月日	平成25年7月10日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	蛍光バイオイメージングを基盤とするペプデュシン細胞内移行機構の解明と新規細胞内送達システムの開発に関する研究
論文審査委員	主査 伊藤 彰 近 副査 竹内 洋 文 副査 佐治木 弘 尚

論文内容の要旨

細胞膜は細胞の内側と外側を区別する境界であり、細胞の恒常性の維持において重要な役割を果たしている。通常、親水性が高い物質やイオン性物質は脂質二重層から成る細胞膜を透過しない。このため、細胞機能の解析や制御、あるいは治療を目的として機能性分子や医薬品を細胞内に導入することは一般的に困難である。そこで、このような膜透過性のない化合物を細胞内へ送達させる方法の確立は、創薬における重要な課題の一つとなっている。

本研究は、ユニークな細胞膜透過能を有するリポ化ペプチドのペプデュシンに着目し、蛍光バイオイメージングを基盤としてその膜透過機構を解明することによって、膜透過性を持たない分子を細胞内に直接送達するための、新規細胞内送達システムの構築を目指す。光イメージング技術は非侵襲性、簡便性に優れ、今日の生命科学分野で不可欠な存在となっている。そこで、本研究では、ペプデュシンの膜透過プロセスを可視化するための新規蛍光プローブを開発し、共焦点蛍光顕微鏡による蛍光バイオイメージング解析を基に、新規送達システムの開発を行う。

1. レドックス感受性蛍光プローブの開発と細胞内移行機構の解析

ペプデュシンは G タンパク質共役受容体 (GPCR) のアロステリックモジュレーターであり、標的とする GPCR の細胞内ループ領域ペプチド配列と脂質から構成される。この分子はフリップ運動によって細胞膜を横切り、ペプチド部位が細胞質側に移行して、GPCR の細胞内領域と相互作用すると考えられている。まず、GPCR の一種の protease activated receptor 1(PAR1)を標的とするペプデュシンの P1pal-13 に、ジスルフィド結合で蛍光団と消光団がつながれた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)機能部位を組み込んで、レドックス感受性蛍光プローブの設計・合成を行った。本プローブは、細胞内の還元的環境に応答して FRET による消光が解除され、細胞内特異的に蛍光を発することができる。

Fmoc 固相合成法によりリポ化ペプチド部位を合成し、別途合成した FRET 機能部位に結合させて種々のプローブを合成した。蛍光団と消光団の位置を入れ替えることで細胞膜局在型及び細胞質放出型の2種類のプローブを作成した。これらのプローブを MCF-7 細胞に投与し、共焦点蛍光顕微鏡によるライブセルイメージングを行って、ペプデュシンの flip 運動を視覚的に捕えることに成功した。

2. PAR1 発現細胞におけるペプデュシンの細胞内動態の解析

PAR1 発現のない MCF7 細胞では、ペプデュシンは膜上で flip 運動し、膜の内側に留まることがわかった。一方、PAR1 が強く発現している MDA-MB-231 細胞において蛍光イメージング解析を行ったところ、エンドソーム様の蛍光が観察され、リソトラッカーで共染色された。さらに、PAR1 抗体による染色により、PAR1 とペプデュシンが共局在していることが明らかになった。これよりペプデュシンは標的 GPCR が発現する細胞では、GPCR のエンドサートーシスを誘導して、それと共に細胞内に取りこまれることが示唆された。

以上により、ペプデュシンは細胞膜上でフリップ運動して細胞内に配向し、その後標的 GPCR の発現の有無で異なる細胞内動態をたどることが明らかになった。このような特徴を生かして、細胞膜、細胞質、エンドソームまたはリソソームなど異なるオルガネラへのターゲティングも可能であると考えられ、ペプデュシン型キャリアはこれまでにない細胞内送達システムとして、有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の細胞内標的作動薬として注目されている人工リポ化ペプチドであるペプデュシン (pepducin) の細胞内移行に着目し、flip 運動を利用した新たな細胞内送達システムを構築することを目指した。まず pepducin の細胞内移行を可視化することのできる蛍光共鳴エネルギー移動システムを組み込んだ pepducin プローブの開発を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によるライブセルイメージングを行った。その結果、pepducin の flip 運動による細胞内移行を生きた細胞で可視化することに初めて成功した。さらに、GPCR の発現が pepducin の細胞内動態に与える影響についても調査した。その結果、GPCR の一つである PAR1 発現の無い細胞では、pepducin は細胞膜上に局在するのに対し、PAR1 発現率の高い細胞では、PAR1 のエンドサイトーシスによる細胞内在化を誘起し、pepducin のエンドソーム移行を示唆する知見を得た。以上、申請者は pepducin が細胞膜上で flip 運動して細胞内に配向し、その後標的 GPCR の発現の有無で異なる細胞内動態をたどることを明らかにした。本知見は、今後の pepducin を基盤とする細胞内送達システム構築及び新たな薬物送達システムへの展開において有用であり、博士 (薬学) 論文として価値あるものと認める。